

GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.L.C.
Intellectual Property Causes
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

4/30/2001

File In: MAILROOM

The Patent Office Date stamp hereon is an acknowledgement that, on the date indicated, the Patent Office received the following:

- ☐ Amendment _____
- ☐ Executed Assignment and cover letter
☐ by facsimile
- ☐ Executed S.E.S. ☐ S.E.S. Assertion
- ☐ Req. for Ext. of Time
- ☐ Fee Filing ☐
Recording ☐
Issue ☐
Extension ☐
- ☐ Fee Transmittal
- ☐ Maintenance Fee Payment
- ☐ PTOL-85B Issue Fee
- ☐ Letter to Draftsman
- ☐ Design Patent Application Transmittal
- ☐ Utility Patent Application Transmittal
- ☐ Provisional Application Cover Sheet
- ☐ Continued Prosecution Application
(CPA) Request Transmittal
- ☐ Request for Continued Examination (RCE)
including Submission
- ☐ Cover Letter
- ☐ Check No. _____ for \$ _____
- ☐ Rule 53b and 53f Letter for
Unexecuted Application
- ☒ Claim of Priority & Certified
Copy^s of JAPANESE APPLICATION NOS.
2000-310693, 2000-078775 + 2001-
015904
- ☐ Declaration ☐ Supplemental
☐ New ☐ Unexecuted
☐ Executed by facsimile
- ☐ Transmittal Letter
- ☐ Patent Application
☐ Provisional ☐ Reexam.
☐ Reissue ☐ Design
☐ Continuation ☐ CIP
_____ pages (w/abstract)
_____ claims _____ independent
_____ sheets of drawings
_____ figures
- ☐ I.D.S. form PTO-1449 &
References ☐ as attached
☐ as listed on
reverse
- ☐ One self-addressed postcard
- ☐ Certification under 1.97(e)
- ☐ Certificate of Mailing (C-O-M)
- ☐ Returned Envelope



In the matter of : POWDER CONTAINING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE

Applicant : Yoshinobu HANYU

COPY

Application No. : 09/810,483

Filed : 3/19/2001

Patent No. :

Issued :

Docket : P20757

SER

P20757.A10

Applicant : Yoshinobu HANYU et al.

Group Art Unit: 1632

Serial No. : 09/810,483

Examiner: Arun Chakrabarti, Ph.D

Filed : March 19, 2001

For : POWDER CONTAINING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE

**REQUEST FOR EXAMINER'S ACKNOWLEDGMENT OF
CLAIM OF PRIORITY AND CERTIFIED COPY (AFTER ALLOWANCE)**

Commissioner of Patents
PO Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

RECEIVED

JUL 17 2003

Office of Patent Publication
Director's Office

Sir :

On May 18, 2001, Applicants filed a Claim of Priority for the above-identified application, claiming priority of Japanese Application Nos. 2000-78775, filed March 21, 2000; 2000-310693, filed October 11, 2000; and 2001-15904, filed January 24, 2001 along with the Certified Copies of the Japanese Priority documents. Applicants also note that the foreign priority documents were listed correctly on the Official Filing Receipt for the above-identified application. However, Applicants note that neither the Claim for Priority nor receipt of the priority documents have ever been acknowledged. Accordingly, Applicants hereby claim the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and respectfully request that the Examiner acknowledge the same, as well as receipt of the Certified Copies of the Japanese Priority Documents.

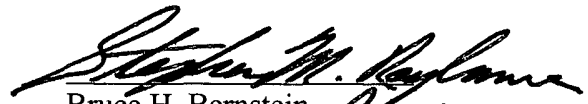
For the convenience of the Examiner, Applicants are submitting herewith a copy of the Claim of Priority and a copies of the Certified Copies of the Priority documents that were filed, along with

P20757.A10

a copy of our date-stamped mailroom receipt evidencing the filing of the Claim of Priority and the Certified Copies of the Priority documents on May 18, 2001.

Should there be any questions, the Examiner is invited to contact the undersigned at the below-listed telephone number.

Respectfully submitted,
Yoshinobu HANYU et al.


Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027
Reg. No. 31,296

July 16, 2003
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

P20757.P05

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Yoshinobu HANYU et al.

Serial No. : 09/810,483

Group Art Unit: Unknown

Filed : March 19, 2001

Examiner : Unknown

For : POWDER CONTAINING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE

CLAIM OF PRIORITY

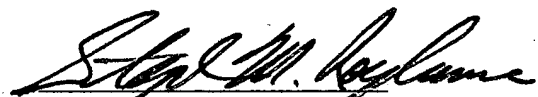
Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

COPY

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 2000-310693, filed October 11, 2000, Application No. 2000-078775, filed March 21, 2000 and Application No. 2001-015904, filed January 24, 2001. As required by 37 C.F.R. 1.55, certified copies of the Japanese applications are being submitted herewith.

Respectfully submitted,
Yoshinobu HANYU et al.



Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027

Reg No 31,296
(Resigned)

April 30, 2001
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年10月11日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-310693

願 人
Applicant(s):

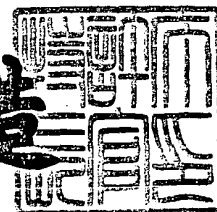
日本ケミカルリサーチ株式会社

COPY

2001年 3月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3013322

【書類名】	特許願
【整理番号】	P111-00
【あて先】	特許庁長官殿
【発明者】	
【住所又は居所】	兵庫県神戸市須磨区菅の台1丁目3-20
【氏名】	破入 洋誠
【発明者】	
【住所又は居所】	兵庫県芦屋市岩園町19-22-106
【氏名】	岡田 麗理子
【発明者】	
【住所又は居所】	兵庫県神戸市垂水区西舞子8丁目20-34
【氏名】	進藤 千尋
【発明者】	
【住所又は居所】	兵庫県神戸市東灘区住吉本町3丁目10-26-103
【氏名】	西室 悟司
【発明者】	
【住所又は居所】	兵庫県神戸市垂水区桃山台1-16 JCRコート31 4
【氏名】	横山 哲雄
【発明者】	
【住所又は居所】	兵庫県神戸市垂水区桃山台1-16 JCRコート31 6
【氏名】	堀江 正人
【特許出願人】	
【識別番号】	000228545
【氏名又は名称】	日本ケミカルリサーチ株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100104639
【弁理士】	

特2000-310693

【氏名又は名称】 早坂 巧

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000- 78775

【出願日】 平成12年 3月21日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063326

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9803334

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生理活性ペプチド含有粉末

【特許請求の範囲】

【請求項1】

生理活性ペプチドを含有する水性液体を乾燥させて該生理活性ペプチド含有の粉末を製造するに際し、該生理活性ペプチドを安定化させるための方法であって、該水性液体に、非イオン性界面活性剤、水溶性の非イオン性有機結合剤、水素添加レシチン及びマンニトールよりなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物を含有させることを特徴とするものである方法。

【請求項2】

生理活性ペプチドを含有する水性液体を乾燥させて該生理活性ペプチド含有の粉末を製造するに際し、該生理活性ペプチドを安定化させるための方法であって、該水性液体にマンニトールを含有させると共に、非イオン性界面活性剤、水溶性の非イオン性有機結合剤及び水素添加レシチンよりなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物を含有させることを特徴とするものである方法。

【請求項3】

生理活性ペプチドを含有する水性液体を乾燥させて該生理活性ペプチド含有の粉末を製造するに際し、該生理活性ペプチドを安定化させるための方法であって、該水性液体に、非イオン性界面活性剤0.01～0.5重量%、水溶性の非イオン性有機結合剤0.01～1重量%、水素添加レシチン、及び該生理活性ペプチド1重量部に対し1～50重量部の比率のマンニトールよりなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物を含有させることを特徴とするものである方法。

【請求項4】

生理活性ペプチドを含有する水性液体を乾燥させて該生理活性ペプチド含有の粉末を製造するに際し、該生理活性ペプチドを安定化させるための方法であって、該水性液体に該生理活性ペプチド1重量部に対し1～50重量部の比率でマンニトールを含有させると共に、非イオン性界面活性剤0.01～0.5重量%、水溶性の非イオン性有機結合剤0.01～1重量%、及び水素添加レシチンよりなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物を含有させることを特徴とするもの

である方法。

【請求項 5】

該水溶性の非イオン性有機結合剤が、ポリビニルピロリドン、水溶性の非イオン性セルロース誘導体及びポリビニルアルコールよりなる群より選ばれるものである、請求項 1 ないし 4 の何れかの方法。

【請求項 6】

該水溶性の非イオン性セルロース誘導体が、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース及びヒドロキシプロピルメチルセルロースよりなる群より選ばれるものである、請求項 5 の方法。

【請求項 7】

該非イオン性界面活性剤が、ポリソルベート、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油及びポロキサマーよりなる群より選ばれるものである、請求項 1 ないし 6 の何れかの方法。

【請求項 8】

該水性液体の乾燥が、噴霧乾燥、凍結乾燥、噴霧凍結乾燥、若しくは流動層コーティングであってよいコーティングにより又は流動層造粒に際してなされるものである、請求項 1 ないし 7 の何れかの方法。

【請求項 9】

該粉末を構成する粒子の平均粒子径が $1 \sim 10 \mu\text{m}$ である、請求項 1 ないし 8 の何れかの方法。

【請求項 10】

該生理活性ペプチドが、成長ホルモン類、インスリン類、カルシトニン類、ソマトスタチン、ソマトスタチン誘導体、インターフェロン、インターロイキン、スーパーオキシドジスムターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、腫瘍壊死因子、コロニー形成刺激因子、カリクレイン、リゾチーム、フィブロンネクチン、インスリン様増殖因子、上皮増殖因子、繊維芽細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、神経成長因子、肝細胞増殖因子、血管新生因子及び血管新生阻害因子よりなる群より選ばれるものである、請求項 1 ないし 9 の何れかの方法。

【請求項 11】

該生理活性ペプチドがヒト成長ホルモン又はヒトインスリンである、請求項 1 ないし 9 の何れかの方法。

【請求項 12】

該生理活性ペプチドがヒト成長ホルモンである、請求項 1 ないし 9 の何れかの方法。

【請求項 13】

生理活性ペプチド並びに、非イオン性界面活性剤、水溶性の非イオン性有機結合剤、水素添加レシチン及びマンニトールよりなる群より選ばれる少なくとも 1 種の化合物を含有する水性液体を乾燥させて粉末とすることを特徴とする、生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項 14】

生理活性ペプチド及びマンニトール並びに、非イオン性界面活性剤、水溶性の非イオン性有機結合剤、及び水素添加レシチンよりなる群より選ばれる少なくとも 1 種の化合物を含有する水性液体を乾燥させて粉末とすることを特徴とする、生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項 15】

生理活性ペプチド並びに、非イオン性界面活性剤 0.01～0.5 重量%、水溶性の非イオン性有機結合剤 0.01～1 重量%、水素添加レシチン、及び該生理活性ペプチド 1 重量部に対して 1～50 重量部の比率のマンニトールよりなる群より選ばれる少なくとも 1 種の化合物を含有する水性液体を乾燥させて粉末とすることを特徴とする、生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項 16】

生理活性ペプチド及び該生理活性ペプチド 1 重量部に対して 1～50 重量部の比率のマンニトール並びに、非イオン性界面活性剤 0.01～0.5 重量%、水溶性の非イオン性有機結合剤 0.01～1 重量%、及び水素添加レシチンよりなる群より選ばれる少なくとも 1 種の化合物を含有する水性液体を乾燥させて粉末とすることを特徴とする、生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項 17】

該水溶性の非イオン性有機結合剤が、ポリビニルピロリドン、水溶性の非イオ

ン性セルロース誘導体及びポリビニルアルコールよりなる群より選ばれるものである、請求項13ないし16の何れかの生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項18】

該水溶性の非イオン性セルロース誘導体が、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース及びヒドロキシプロピルメチルセルロースよりなる群より選ばれるものである、請求項17の生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項19】

該非イオン性界面活性剤が、ポリソルベート、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油及びポロキサマーよりなる群より選ばれるものである、請求項13ないし18の何れかの生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項20】

該水性液体の乾燥が、噴霧乾燥、凍結乾燥、噴霧凍結乾燥、若しくは流動層コーティングであってよいコーティングにより又は流動層造粒に際してなされるものである、請求項13ないし19の何れかの生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項21】

該粉末を構成する粒子の平均粒子径が1～10 μ mである、請求項13ないし20の何れかの生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項22】

該生理活性ペプチドが、成長ホルモン類、インスリン類、カルシトニン類、ソマトスタチン、ソマトスタチン誘導体、インターフェロン、インターロイキン、スーパーオキシドジスムターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、腫瘍壊死因子、コロニー形成刺激因子、カリクレイン、リゾチーム、フィブロンネクチン、インスリン様増殖因子、上皮増殖因子、繊維芽細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、神経成長因子、肝細胞増殖因子、血管新生因子及び血管新生阻害因子よりなる群より選ばれるものである、請求項13ないし21の何れかの生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項23】

該生理活性ペプチドがヒト成長ホルモン又はヒトインスリンである、請求項13ないし21の何れかの生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項24】

該生理活性ペプチドがヒト成長ホルモンである、13ないし21の何れかの生理活性ペプチド含有粉末の製造方法。

【請求項25】

重量比1:1~1:50で生理活性ペプチドとマンニトールとを含んでなる粒子よりなることを特徴とする、生理活性ペプチド含有粉末。

【請求項26】

該粒子が、該生理活性ペプチド1重量部に対し非イオン性界面活性剤0.05~3重量部、水溶性の非イオン性有機結合剤0.05~6重量部及び水素添加レシチンのうち、少なくとも何れかを更に含んでなるものである、請求項25又の生理活性ペプチド含有粉末。

【請求項27】

該粒子の平均粒子径が1~10 μ mであることを特徴とする、請求項25又は26の生理活性ペプチド含有粉末。

【請求項28】

該水溶液の乾燥が、噴霧乾燥、噴霧凍結乾燥又は凍結乾燥によりなされたものである、請求項25ないし27の何れかの生理活性ペプチド含有粉末。

【請求項29】

該生理活性ペプチドが、成長ホルモン類、インスリン類、カルシトニン類、ソマトスタチン、ソマトスタチン誘導体、インターフェロン、インターロイキン、スーパオキシドジスムターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、腫瘍壊死因子、コロニー形成刺激因子、カリクレイン、リゾチーム、フィブロンネクチン、インスリン様増殖因子、上皮増殖因子、繊維芽細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、神経成長因子、肝細胞増殖因子、血管新生因子及び血管新生阻害因子よりなる群より選ばれるものである、請求項25ないし28の何れかの生理活性ペプチド含有粉末。

【請求項30】

該生理活性ペプチドがヒト成長ホルモン又はヒトインスリンである、請求項25ないし28の何れかの生理活性ペプチド含有粉末。

【請求項31】

該生理活性ペプチドがヒト成長ホルモンである、請求項25ないし28の何れかの生理活性ペプチド含有粉末。

【請求項32】

請求項25ないし31の何れかの粒子を含んでなることを特徴とする、生理活性ペプチド含有吸入用製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生理活性ペプチド含有粉末に関し、より詳しくは、生理活性ペプチド含有の水性液体中を乾燥させて粉末化する工程において、生理活性ペプチドの変性を防止して安定化することにより変性ペプチドの混在を抑えた、粉末ペプチド粉末に関する。本発明は更に、吸入により経肺投与又は経鼻投与するのに適した生理活性ペプチド含有粉末に関する。

【0002】

【従来の技術】

これまで、生理活性ペプチド含有の医薬品は、注射により投与されてきた。その関係上、それらの製剤の製造には凍結乾燥が専ら用いられてきた。このため、それらの製剤において、主薬である生理活性ペプチドの安定化についての研究は、完成品である製剤の乾燥状態における生理活性ペプチドの長期保存安定性、及び乾燥したペプチド含有組成物を溶解した後の液体中での生理活性ペプチドの保存安定性に、これまで集中してきた。例えば、カルシトニン溶液の安定化については、特開平7-179364号公報、特開平7-188060号公報、特表平7-188061号公報等に、また、成長ホルモン凍結乾燥品の安定化については、特表平10-504531号公報、特表平10-511965号公報、特表平10-507183号公報等に掲示されている。

【0003】

生理活性ペプチドの投与方法が注射に限られてきたのは、経口投与では消化管

内で消化されてしまうためであり、実用可能な新たな投与経路が開発できれば、患者にとって非常に有益である。取り分け、成長ホルモンやインスリン等のように、ほぼ生涯にわたって投与を続ける必要のある活性ペプチドの場合、従来の注射による投与は患者に不便と苦痛を強いている。従って、これらの生理活性ペプチドに関して、注射以外の投与経路の開発は患者に切望されている。

【0004】

一方、薬物を全身投与するに当たって、注射剤、内服剤、坐剤等の従来の製剤と異なった新たな投与経路を利用する製剤として、吸入することにより薬効成分の経肺吸収をはかる製剤（本明細書において「吸入用製剤」という。）や、鼻腔内に投与し鼻粘膜を通して薬効成分を吸収させる経鼻製剤が研究されている。これらの製剤は、体内に直接注入するものでなく、気道粘膜等、外気に接する粘膜表面に適用されるため、微生物学的品質基準は注射剤に比して緩やかである。このため、その製造には、凍結乾燥装置を用い得ることは勿論、それ以外に流動層造粒装置、噴霧乾燥装置、噴霧凍結乾燥装置等の製造装置も用い得る。これら流動層造粒装置、噴霧乾燥装置、噴霧凍結乾燥装置を用いた製剤の製造段階における生理活性ペプチドの安定化に関しては、メイラード反応に対する阻害剤を添加することで安定性を確保することが報告されている（特表平10-505591号公報）。しかし、製造段階における生理活性ペプチドの安定化は、もし可能であるなら、医薬品添加物として現在許可されており、安全性が高く、長年の使用実績のある添加物を用いて行う方が、得られる医薬品につき高い安全性が期待できるという点で、好ましい。また、生理活性ペプチドの吸収及び血中への移行を十分な効率で可能にするものでなければならない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の一目的は、生理活性ペプチドを含有する水性液体を乾燥させて粉末化する工程における生理活性ペプチドの安定性を改善する方法、及び該方法により製造される、生理活性ペプチド含有の粉末を提供することである。

本発明の別の目的は、吸入により生理活性ペプチドを吸収させるのに特に適した生理活性ペプチド含有粉末、及び吸入用製剤を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、生理活性ペプチド含有粉末を製造するに当たり、生理活性ペプチド含有水性液体を乾燥させて生理活性ペプチド含有粉末を製造する工程において、所定の化合物を該水性液体に加えておくことにより、粉末化に際して生理活性ペプチドの安定性が著しく高められることを見出した。更に本発明等は、そのようにして製造した粉末は、を動物に経肺投与したとき、生理活性ペプチドが優れた効率で吸収されて血中に移行することを見出した。本発明は、これらの発見に基づくものである。

【0007】

すなわち本発明は、生理活性ペプチドを含有する水性液体を乾燥させて該生理活性ペプチド含有の粉末を製造するに際し、該生理活性ペプチドを安定化させるための方法であって、該水性液体に、非イオン性界面活性剤、水溶性の非イオン性有機結合剤、水素添加レシチン及びマンニトールよりなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物を含有させることを特徴とするものである方法を提供する。この方法において、非イオン性界面活性剤、水溶性の非イオン性有機結合剤、水素添加レシチン、又はマンニトールは、水溶液から生理活性ペプチドを粉末化する際に安定化剤として働く。従って、これらの何れか1種又は2種以上を用いることにより、水溶液からの粉末化に際して二量体形成等の変性が起こるのが抑制され、実質的に変性のない生理活性ペプチド粉末を製造することが可能となる。

【0008】

また本発明は、生理活性ペプチドを含有する水性液体を乾燥させて該生理活性ペプチド含有の粉末を製造するに際し、該生理活性ペプチドを安定化させるための方法であって、該水性液体にマンニトールを含有させると共に、非イオン性界面活性剤、水溶性の非イオン性有機結合剤、及び水素添加レシチンよりなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物を含有させることを特徴とするものである方法をも提供する。この方法は、上記特徴に加えて、生理活性ペプチドの特に優れた経肺吸収をもたらす粉末を製造することを可能にする

【0009】

上記の各安定化方法において、非イオン性界面活性剤又は水溶性の非イオン性有機結合剤を該水性液体中に含有させる場合、高い安定化効果を発揮する濃度範囲は、非イオン性界面活性剤については0.01~0.5重量%、水溶性の非イオン性有機結合剤については0.01~1重量%である。また、マンニトールが高い安定化効果を発揮するのは、生理活性ペプチド1重量部に対し1~5.0重量部のマンニトールを含有させたときである。

【0010】

上記において、非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油及びポロキサマー（ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックコポリマー：Pluronic）よりなる群より選ばれるものであることが更に好ましい。

【0011】

また上記において水溶性の非イオン性有機結合剤は、ポリビニルピロリドン、水溶性の非イオン性セルロース誘導体及びポリビニルアルコールよりなる群より選ばれるものであることが、更に好ましい。

【0012】

また、該水溶性の非イオン性セルロース誘導体は、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース及びヒドロキシプロピルメチルセルロースよりなる群より選ばれるものであることが更に好ましい。

【0013】

これらの安定化剤は、上記範囲からある程度外れてもかなりの効果を有するが、上記範囲内では効果は顕著である。非イオン性界面活性剤の更に好ましい濃度範囲は0.05~0.3重量%であり、この範囲では取り分け強い安定化効果が得られる。水溶性の非イオン性有機結合剤については、上記より更に好ましい濃度範囲は0.02~0.5重量%であり、この範囲では取り分け強い安定化効果が得られる。また、水素添加レシチンについては、0.01重量%でも既に特に顕著な効果が得られ、0.5~1重量%にかけて効果のピークがあるが、この範囲を超えて2重量%でも著しい効果が維持されており、ピーク濃度を超えての濃度上昇に対する効果の低下はごく緩やかである。従って、水素添加レシチンにつ

いては実質的な安定化効果のなくなる上限濃度は明らかでないが、添加剤として十分な効果がある限り無闇に多量に水素添加レシチンを添加する必要はないから、濃度は製剤の製造時の取り扱い易さなどを考慮して、適宜定めればよい。通常は、水素添加レシチンの好ましい濃度は、0.005～4重量%程度の範囲であり、更に好ましくは0.01～2重量%の範囲である。また、生理活性ペプチドとマンニトールとの重量比は、投与時の粉末の取扱いに不便でない限り投与する粉末の総重量を少なくする方がよいという観点から、より好ましくは1:1～1:40、更に好ましくは1:1～1:30、尚も更に好ましくは1:1～1:20、特に好ましくは1:1～10である。生理活性ペプチドの安定化には、これらの安定化剤の何れかを単独で用いてもよく、複数を併用してもよい。併用した場合、何れかを単独で用いるよりも更に優れた安定化効果が得られ、二量体等の変性ペプチドの発生をほぼ完全に防止することも可能となる。

【0014】

本発明は、水性液体を乾燥させるに際して生理活性ペプチドの安定化効果を発揮することの判明した所定の化合物を用いるものであり、それら所定の化合物は具体的な種々の乾燥方式において用いることができる。上記において、水性液体の乾燥方法の例としては、噴霧乾燥、凍結乾燥、噴霧凍結乾燥が挙げられ、更には、溶液を噴霧して乾燥させる工程を含んでいる種々の工程例が挙げられる。すなわち、流動層造粒、またコア粒子表面上へのコーティングを行うことのできる、例えば流動層コーティングを含む種々のコーティング、コア粒子表面上へのコーティング又は担持を伴う流動層造粒に際して造粒と同時に達成される乾燥が挙げられるが、これらの方法に限定されない。

【0015】

更に、該粒子の平均粒子径が1～10 μ m、更に好ましくは2～5 μ mであるとき、吸入された粒子は気流に乗って呼吸器の深部まで到達しやすい。そのような粒子径としたとき、上記の各方法により安定化して得られる生理活性ペプチド含有粉末は、吸入したとき粒子が呼吸器深部に到達しやすく、その結果該生理活性ペプチドを優れた効率でかつ比較的持続的に循環血中へ移行させることができる。すなわち本発明は更に、上記方法であって、粉末を構成する粒子の平均粒子

径が1～10 μm 、更に好ましくは2～5 μm である方法をも提供する。

【0016】

本発明において、安定化の対象となる生理活性ペプチドの例としては、カルシトニン類、インスリン類、成長ホルモン類、ソマトスタチン、ソマトスタチン誘導体、インターフェロン（ α 型、 β 型、又は γ 型）、インターロイキン（I、II、III、IV、V、VI、又はVII）スーパーオキシドジスムターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、腫瘍壊死因子、コロニー形成刺激因子、カリクレイン、リゾチーム及びフィブロンネクチン、並びに、インスリン様増殖因子、上皮増殖因子、繊維芽細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、神経成長因子、肝細胞増殖因子、血管新生因子及び血管新生阻害因子等、各種の細胞増殖・分化を調節する因子等が挙げられる。生理活性ペプチドは、化学的には複数のアミノ酸がペプチド結合によって連結したという共通の構造を有しており、従って、本発明は、上記以外にも広範な種々の生理活性ペプチドに適用可能である。また、それらのペプチドが天然物から抽出されたものか遺伝子組換えにより製造されたものかは、ペプチドの基本的物性に影響を及ぼさないから、何れの方法により得られたものかは問わない。これら種々の生理活性ペプチドのうちヒト成長ホルモン及びインスリンは、これまでは、患者が長期間、皮下注射により自家投与を続けるほかなかった関係上、本願において特に好ましい生理活性ペプチドである。

【0017】

上記安定化方法に加えて、本発明は生理活性ペプチド含有粉末の製造方法をも提供する。該製造方法は、生理活性ペプチド並びに、非イオン性界面活性剤、水溶性の非イオン性有機結合剤、水素添加レシチン、及び／又はマンニトールを含有する水性液体を乾燥させて粉末とすることを特徴とする。生理活性ペプチドに加えたこれら1種又は2種以上の安定化剤により、水溶液からの粉末化に際して二量体形成等の変性が起こるのが抑制され、実質的に変性のない生理活性ペプチド粉末が得られる。

【0018】

本発明は更に、生理活性ペプチド及びマンニトール並びに、非イオン性界面活性剤、水溶性の非イオン性有機結合剤及び水素添加レシチンよりなる群より選ば

れる少なくとも1種の化合物を含有する水性液体を乾燥させて粉末とすることを特徴とする、生理活性ペプチド含有粉末の製造方法をも提供する。この製造は、上記特徴に加えて、生理活性ペプチドの特に優れた経肺吸収をもたらす粉末を与える。

【0019】

上記の製造方法において、非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油及びポロキサマー（ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックコポリマー：Pluronic）よりなる群より選ばれるものであることが更に好ましい。また、水溶性の非イオン性有機結合剤は、ポリビニルピロリドン、水溶性の非イオン性セルロース誘導体及びポリビニルアルコールよりなる群より選ばれるものであることが、更に好ましい。また、また、該水溶性の非イオン性セルロース誘導体は、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース及びヒドロキシプロピルメチルセルロースよりなる群より選ばれるものであることが更に好ましい。

【0020】

上記の製造方法において、列記した安定化剤についての好ましい使用量範囲は、該生理活性ペプチドを安定化させるための方法において上述したのと同様である。すなわち、非イオン性界面活性剤の更に好ましい濃度範囲は0.05～0.3重量%であり、水溶性の非イオン性有機結合剤の更に好ましい濃度範囲は0.02～0.5重量%である。また、水素添加レシチンについては実質的な安定化効果のなくなる上限濃度は明らかでないが、添加剤として十分な効果がある限り無闇に多量に水素添加レシチンを添加する必要はないから、濃度は製剤の製造時の取り扱い易さなどを考慮して、適宜定めればよい。通常は、水素添加レシチンの好ましい濃度は、0.005～4重量%程度の範囲であり、更に好ましくは0.01～2重量%の範囲である。また、生理活性ペプチドとマンニトールとの重量比は、より好ましくは1:1～1:40、更に好ましくは1:1～1:30、尚も更に好ましくは1:1～1:20、特に好ましくは1:1～1:10である。

【0021】

上記の製造方法において、水性液体の乾燥方法としては、例えば噴霧乾燥、凍結乾燥、噴霧凍結乾燥等により、また流動層造粒、またコア粒子表面上へのコーティングを行うことのできる、例えば流動層コーティングを含む種々のコーティング、コア粒子表面上へのコーティング又は担持を伴う流動層造粒等において行うことができるが、これらの方法に限定されない。

【0022】

上記の製造方法において粉末を構成する粒子の平均粒子径は、生理活性ペプチドの経肺投与の観点から、 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ であることが更に好ましい。

【0023】

上記製造方法により粉末とされる生理活性ペプチドの範囲は、上記安定化方法において述べたのと同様である。

【0024】

更に、本発明は、重量比 $1 : 1 \sim 1 : 50$ で生理活性ペプチドとマンニトールとを含んでなる粒子よりなることを特徴とする、生理活性ペプチド含有粉末をも提供する。該粉末は、更に好ましくは、該粉末を構成する粒子が生理活性ペプチド 1 重量部に対し非イオン性界面活性剤 0.05～3 重量部、水溶性の非イオン性有機結合剤 0.05～6 重量部及び水素添加レシチンのうち、少なくとも何れかを更に含む。これらの粉末は、呼吸器深部の粘膜を介した生理活性ペプチドの優れた吸収をもたらすことができる。

【0025】

上記粒子において、投与すべき所定量の生理活性ペプチドに対して吸入される粉末の総重量を少なくする観点からは、生理活性ペプチドとマンニトールとの重量比は、より好ましくは $1 : 1 \sim 1 : 40$ 、更に好ましくは $1 : 1 \sim 1 : 30$ 、尚も更に好ましくは $1 : 1 \sim 1 : 20$ 、特に好ましくは $1 : 1 \sim 1 : 10$ である。また、生理活性ペプチド 1 重量部に対する非イオン性界面活性剤量は、更に好ましくは、0.25～1.8 重量部であり、この範囲では非イオン性界面活性剤の使用量を抑制しつつ生理活性ペプチドの効率的吸収をはかることができる。同様に、生理活性ペプチド 1 重量部に対する水溶性の非イオン性有機結合剤量は、

更に好ましくは0.1～3重量部である。

【0026】

該生理活性ペプチド含有粉末は、更に好ましくは該粉末を構成する粒子の平均粒子径が1～10 μ mであり、更に好ましくは2～5 μ mである。このような平均粒径とすることにより、該粉末は吸入により呼吸器深部まで到達しやすくなり、優れた生理活性ペプチドの吸収の効率が高まる。

【0027】

該生理活性ペプチド含有粉末の製造方法は、限定されない。例えば、噴霧乾燥、噴霧凍結乾燥又は凍結乾燥によって製造されたものであってよい。

【0028】

上記生理活性ペプチド含有粉末における生理活性ペプチドの範囲は、前記安定化方法において述べたのと同様である。

【0029】

本発明は更に、上記生理活性ペプチド含有の粒子を含んでなることを特徴とする、生理活性ペプチド含有吸入用製剤をも提供する。該吸入用製剤は、上記生理活性ペプチド含有の粒子そのままであってもよいが、該粒子が相互に緩く凝集したもの又は該粒子を、より粗大な不活性の担体粒子（例えば乳糖）表面に緩く付着させたものであってよい。それらの緩い凝集体粒子又は緩い複合粗大粒子は、製剤の吸引時に吸入装置から放出されるに際して空気流により崩壊して生理活性ペプチド含有の各粒子が凝集体又は担体から遊離し単独粒子となるような緩さのものであればよい。そのような緩い凝集体粒子又は緩い複合粗大粒子の製造は、粉末を構成する1～数 μ mオーダーの粒子を緩く凝集させ又はより粗大な不活性の担体粒子表面に緩く付着させる当業者に周知の種々の技術を適宜用いて行うことができる。それらの緩い凝集体粒子又は緩い複合粗大粒子は、吸入装置で用いる所定のカプセル等に吸入用製剤を一回投与量毎に充填する際に、製剤の流動性を高めて、充填を容易にし充填量の正確さを高めることを目的とするものである。従って、カプセル等に充填後は、外部からの衝撃等によりカプセル等の中で一部又は全部の粒子が遊離して単独粒子となって粉末を形成していてもよい。

【0030】

【発明の実施の形態】

本発明において、「生理活性ペプチドを含有する水性液体」とは、生理活性ペプチド水溶液そのもののみならず、これに更に、生理活性ペプチドの安定性に悪影響を及ぼさない他の成分、例えば、リン酸塩等の緩衝剤、薬剤学的に許容し得る塩化ナトリウム等の塩類、ソルビトール等の増量剤を含有するものも含む。

【0031】

また、本発明の安定化方法は、水性液体に溶解した状態の生理活性ペプチドを、水性液体中の水分等が蒸発する過程で生理活性ペプチドを安定化できるものであるから、生理活性ペプチドに対して化学的に不活性な例えば乳糖等の、より粗大な粒子の表面にコーティングさせた形で乾燥させても、生理活性ペプチドの安定化には影響を与えない。そのような不活性な微粒子は、安定化剤と混ざり合った生理活性ペプチドを表面上にコーティングされた形で担持するコアとして働くことができる。

【0032】

また本発明の生理活性ペプチド含有粉末は、生理活性ペプチドとマンニトールとを含んでなる粒子が非常に高い経肺吸収をもたらすという発見に基づいており、従って、生理活性ペプチド含有粉末を製造するに当たり、適宜の製法を選択してよい。本発明の生理活性ペプチド含有粉末の製造方法は、活性ペプチド含有水溶液から活性ペプチドを粉末化する際において、活性ペプチドを顕著に安定化する作用をマンニトールが有するという発見にも基づいており、従って、生理活性物質及びマンニトールを含有する水溶液の乾燥は、通常用いられる適宜の方法を採用して行ってもよい。

【0033】

また、本発明において特に好ましく用いられる生理活性ペプチドの一例として、ヒト成長ホルモンがある。本発明において、「ヒト成長ホルモン」の語は、ヒト下垂体より抽出できる191個のアミノ酸からなる分子量22,125の22K hGHのみならず、32～46番目の15アミノ酸の欠失した20K hGHをも包含する。20K hGHは22K hGHと同等の成長促進作用を示す。また、本発明において、「ヒト成長ホルモン」の語は、これら天然型ヒト成長ホルモンのみならず、天然ヒ

ト成長ホルモンと実質的に同等の作用を有する遺伝子組換えにより得られたタンパク質をも含む。遺伝子組換えによるヒト成長ホルモンとしては、192個のアミノ酸よりなるN末端メチオニン型のものが例示されるほか、一部のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されているが天然型のヒト成長ホルモンと実質的に同等の活性を有する変異体もこれに包含される。

【0034】

【実施例】

活性ペプチドのうち、成長ホルモン（GH）分子は、水溶液中での激しい攪拌時に気液界面に接触して立体構造変化を起こし単量体の減少及び、2量体、多量体又は不溶性凝集体を形成しやすいほか、脱アミド体を生成する性質が強い。特に、GHの粉末化の工程においては、噴霧乾燥などの乾燥段階では気液界面が増大するため、これによるGHの変性をできるだけ抑制する必要がある。以下、GHを安定化する化合物を求めて、以下に種々検討した。以下の比較例及び実施例では、活性ペプチドの代表例としてヒト成長ホルモンを選んだ。

【0035】

以下の比較例及び実施例において用いたヒト成長ホルモンは、アミノ酸191個の天然ヒト成長ホルモン（22K hGH）と同一のアミノ酸配列を有する組換えヒト成長ホルモンである（末端Nメチオニンを選択的に酵素切断除去したもの）。またこの組換えヒト成長ホルモンについて、「グロウジェクト注4IU」と表示したときは、医薬製品である（グロウジェクト注4IU：日本ケミカルリサーチ株式会社）を用いたことを示す。グロウジェクト注4IUの組成は下記の通りである。また、この組換えヒト成長ホルモンについて「原体」と特記したときは、添加物を含まない純粋の組換えヒト成長ホルモン（BTG社製）を示す。

【0036】

r-hGH注射剤（グロウジェクト注4IU）：

（処方）

r-hGH 4 IU (1.7mg)

リン酸水素ナトリウム 2.2 mg

リン酸二水素ナトリウム 0.35 mg

塩化ナトリウム・・・・・・1.0 mg

D-マンニトール・・・・・・20.0 mg

【0037】

また、生理活性ペプチドを含有する水性液体の乾燥のための代表例として、噴霧乾燥をモデルとして用いて行った試験を示す。噴霧乾燥には用いた装置は、Splay Dryer SD-1000 (EYELA社)である。

【0038】

生理活性ペプチド r-hGH の安定性の指標としては、生理活性ペプチドの安定化の最もよい指標と考えられる生理活性ペプチド単量体の残存率を用いた。残存率の算出は、乾燥前の水性液体中（噴霧乾燥処理前）の生理活性ペプチド濃度と、粉末化したもの（噴霧乾燥処理品）をもとの液量へと復元した溶液中の生理活性ペプチドの残存率に基づき、次式に従って行った。

$$\text{生理活性ペプチド単量体残存率 (\%)} = A_p / A_I \times 100$$

ここに：

A_p = 噴霧乾燥処理品の HPLC における単量体ピーク面積

A_I = 噴霧乾燥処理前の HPLC における単量体ピーク面積

【0039】

<比較例1>

r-hGH 注射剤（グロウジェクト注4IU）のバイアル15本にそれぞれ精製水1.0mlを加え、注射剤を完全に溶解させた。得られた r-hGH 溶液（15バイアル分：15.0ml）を噴霧乾燥し、乾燥粉末を得た。Splay Dryer SD-1000 における噴霧乾燥条件は次の通りとした。

（噴霧乾燥条件）

入口温度： 80℃

噴霧圧： 150 kPa

乾燥空気量： 0.3m³/分

送液ポンプ流量： 2.6ml/分

【0040】

また、単量体の測定のための HPLC 条件は次の通りである。

(HPLC条件)

装置: LC10A (島津製作所)

検出器: UV (280nm)

分析カラム: TSK G3000SW_{XL}

カラム温度: 室温

移動相: 50mMリン酸二水素ナトリウム、50mMリン酸水素ナトリウム、0.2M塩化ナトリウム

流速: 0.6ml/分

注入量: 50 μ l

【0041】

<比較例2>

r-hGH注射剤（グロウジェクト注4IU）のバイアルを15本ずつ5セット用意し、それぞれ精製水1.0mlを加え、注射剤を完全に溶解させた。得られたr-hGH溶液（各セット15バイアル分：15.0ml）を噴霧乾燥し、乾燥粉末を得た。Splay Dryer SD-1000における噴霧乾燥条件は、比較例1と異なり、次の通りとした。なお、単量体の測定のためのHPLC条件は、比較例1と同一とした。

(噴霧乾燥条件)

入口温度: 90℃

噴霧圧: 100kPa

乾燥空気量: 0.2m³/分

送液ポンプ流量: 2.6ml/分

【0042】

<実施例1>

非イオン性界面活性剤水溶液として、異なった濃度のTween 20水溶液（濃度：0.01、0.05、0.1、0.5、1.0及び2.0w/w%）を調製した。各濃度のTween 20水溶液に対してr-hGH注射剤（グロウジェクト注4IU）のバイアルを15本ずつ用意し、各濃度のTween 20水溶液をそれに対応する15本のバイアルに1.0mlずつ加えて、注射剤を完全に溶解させた。こうして得られた、各Tween 20濃度のr

r-hGH溶液（各Tween 20濃度につき15バイアル分：15.0ml）を噴霧乾燥し、乾燥粉末を得た。噴霧乾燥条件及びHPLC条件は比較例1と同一とした。

【0043】

<実施例2>

非イオン性界面活性剤水溶液として、異なった濃度のHCO-60（ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60）水溶液（濃度：0.01、0.05、0.1、0.5、1.0及び2.0w/w%）を調製した。各濃度のHCO-60水溶液に対してr-hGH注射剤（グロウジェクト注4IU）のバイアルを15本ずつ用意し、各濃度のHCO-60水溶液をそれに対応する15本のバイアルに1.0mlずつ加えて、注射剤を完全に溶解させた。こうして得られた、各HCO-60濃度のr-hGH溶液（各HCO-60濃度につき15バイアル分：15.0ml）を噴霧乾燥し、乾燥粉末を得た。噴霧乾燥条件及びHPLC条件は比較例1と同一とした。

【0044】

<実施例3>

非イオン性界面活性剤水溶液として、異なった濃度のPluronic F68（ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコール）水溶液（濃度：0.01、0.05、0.1、0.5、1.0及び2.0w/w%）を調製した。各濃度のPluronic F68水溶液に対してr-hGH注射剤（グロウジェクト注4IU）のバイアルを15本ずつ用意し、各濃度のPluronic F68水溶液をそれに対応する15本のバイアルに1.0mlずつ加えて、注射剤を完全に溶解させた。こうして得られた、各Pluronic F68濃度のr-hGH溶液（各Pluronic F68濃度につき15バイアル分：15.0ml）を噴霧乾燥し、乾燥粉末を得た。噴霧乾燥条件及びHPLC条件は比較例1と同一とした。

【0045】

<実施例4>

水溶性の非イオン性有機結合剤水溶液として、異なった濃度のKollidone 17PF（ポリビニルピロリドン：BASF）水溶液（濃度：0.01、0.05、0.1、0.5、1.0及び2.0w/w%）を調製した。各濃度のKollidone 17PF水溶液に対してr-hGH注射剤（グロウジェクト注4IU）のバイアルを15本ずつ用意し、各濃度のKol

lidone 17PF水溶液をそれに対応する15本のバイアルに1.0mlずつ加えて、注射剤を完全に溶解させた。こうして得られた、各Kollidone 17PF濃度のr-hGH溶液（各Kollidone 17PF濃度につき15バイアル分：15.0ml）を噴霧乾燥し、乾燥粉末を得た。噴霧乾燥条件及びHPLC条件は比較例1と同一とした。

【0046】

＜実施例5＞

水溶性の非イオン性有機結合剤として、異なった濃度のKollidone 12PF（ポリビニルピロリドン：BASF）水溶液（濃度：0.01、0.05、0.1、0.5、1.0及び2.0w/w%）を調製した。各濃度のKollidone 12PF水溶液に対してr-hGH注射剤（グロウジェクト注4IU）のバイアルを15本ずつ用意し、各濃度のKollidone 12PF水溶液をそれに対応する15本のバイアルに1.0mlずつ加えて、注射剤を完全に溶解させた。こうして得られた、各Kollidone 12PF濃度のr-hGH溶液（各Kollidone 12PF濃度につき15バイアル分：15.0ml）を噴霧乾燥し、乾燥粉末を得た。噴霧乾燥条件及びHPLC条件は比較例1と同一とした。

【0047】

＜実施例6＞

水溶性の非イオン性有機結合剤として、異なった濃度のHPC-SSL（ヒドロキシプロピルセルロース：東洋曹達株式会社）水溶液（濃度：0.01、0.05、0.1、0.5及び1.0w/w%）を調製した。各濃度のHPC-SSL水溶液に対してr-hGH注射剤（グロウジェクト注4IU）のバイアルを15本ずつ用意し、各濃度のHPC-SSL水溶液をそれに対応する15本のバイアルに1.0mlずつ加えて、注射剤を完全に溶解させた。こうして得られた、各HPC-SSL濃度のr-hGH溶液（各HPC-SSL濃度につき15バイアル分：15.0ml）を噴霧乾燥し、乾燥粉末を得た。噴霧乾燥条件及びHPLC条件は比較例1と同一とした。

【0048】

＜実施例7＞

非イオン性界面活性剤水溶液として、異なった濃度のレシノールS-10E（水素添加レシチン：日光ケミカルズ株式会社）水溶液（濃度：0.01、0.05、0.1、0.5、1.0及び2.0w/w%）を調製した。各濃度の水素添加レシチン水溶液に対して

r-hGH注射剤（グロウジェクト注4IU）のバイアルを15本ずつ用意し、各濃度の水素添加レシチン水溶液をそれに対応する15本のバイアルに1.0mlずつ加えて、注射剤を完全に溶解させた。こうして得られた、各水素添加レシチン濃度のr-hGH溶液（各水素添加レシチン濃度につき15バイアル分：15.0ml）を噴霧乾燥し、乾燥粉末を得た。噴霧乾燥条件及びHPLC条件は比較例1と同一とした。

【0049】

<実施例8>

HPC-SSL（ヒドロキシプロピルセルロース）と各非イオン性界面活性剤とを次の表に示した組み合わせで同時に含有する各水溶液を調製した。

【表1】

水溶液No.	HPC-SSL濃度 (w/w%)	非イオン性界面活性剤及び濃度 (w/w%)	
A	0.05	HCO-60	0.05
B	0.05	Pluronic F68	0.05
C	0.05	Pluronic F68	0.10
D	0.10	HCO-60	0.05
E	0.10	HCO-60	0.10

各組み合わせでHPC-SSL及び非イオン性界面活性剤を含有する水溶液の各々に対してr-hGH注射剤（グロウジェクト注4IU）のバイアルを15本ずつ5セット用意し、各水溶液をそれに対応する各セット15本のバイアルに1.0mlずつ加えて、注射剤を完全に溶解させた。こうして得られた、各r-hGH溶液（各組み合わせにつき各セット15バイアル分：15.0ml）を噴霧乾燥し、乾燥粉末を得た。噴霧乾燥条件は比較例2と同一とし、HPLC条件は比較例1と同一とした。

【0050】

<測定結果>

比較例 1 及び実施例 1 ～ 3 につき、H P L C 測定結果を図 1 に示す。

図に見られるように、ある濃度範囲の非イオン性界面活性剤の濃度は、水溶液から粉末化する過程における生理活性ペプチド r - h G H の単量体残存率を、著しく改善した。すなわち、非イオン性界面活性剤を含有しない比較例 1 では、粉末化の前後で r - h G H の単量体は 40 % 台にまで減少しているのとは対照的に、実施例 1 ～ 3 の製剤のうち、水溶液中 0.01 ～ 0.5 w / w % までの濃度に非イオン性界面活性剤を含有させておいたものでは、r - h G H の単量体が遙かに高い残存率を以て維持されている。また、図より、安定化のピークは非イオン性界面活性剤濃度 0.1 w / w % 付近にあることが分かる。また実測点はないものの、例えば非イオン性界面活性剤の濃度 0.3 w / w % 付近では、0.5 w / w % の点より更に高い安定化効果のあることは明らかである。

[0 0 5 1]

比較例 1 及び実施例 4 ～ 6 につき、H P L C 測定結果を図 2 に示す。

図に見られるように、水溶性の非イオン性有機結合剤は、水溶液から粉末化する過程における生理活性ペプチド r - h G H の単量体残存率を、大きく改善した。実施例 4 (Kollidone 17PF) 及び 5 (Kollidone 12PF) については試験した何れの濃度でも改善が見られ、特に 1 w / w % までの濃度において安定化効果が強く、また効果のピークは、濃度 0.1 w / w % の点に認められた。実施例 6 (ヒドロキシプロピルセルロース) については、安定化効果は他のものに比しても更に顕著であり、その効果がピークとなる濃度である 0.1 w / w % においては、r - h G H は約 95 % の残存率を示した。この実施例においては、ヒドロキシプロピルセルロース濃度として 1 w / w % までしか試験を行っていないが、1 w / w % の濃度において実施例 4 及び 5 における同濃度での安定化効果より遙かに高く、ピーク点を超えた濃度の上昇に伴う効果の減退傾向も実施例 4 及び 5 についてのグラフに比して特段に大きくはないことから、2 w / w % でも安定化効果が見られるであろうことはほぼ明らかである。

[0 0 5 2]

比較例 1 及び実施例 7 につき、H P L C 測定結果を図 3 に示す。

図に見られるように、実施例7で用いた水素添加レシチンは、試験した2w/w%までの何れの濃度でも、r-hGHに対して著しく強い安定化効果を示した。特に、水素添加レシチンの安定化効果は、試験した最低濃度0.01w/w%においてもr-hGH残存率で70%を超えており、この濃度を超過して0.2w/w%までの範囲では、更に高い安定化効果を示している。また効果のピークは、図より0.5~1w/w%付近にあるものと思われるが、ピークを超えても効果の減退傾向は小さく、試験した範囲より遙かに広い範囲で顕著な安定化効果を有することは明らかである。

【0053】

比較例2及び実施例8につき、HPLC測定結果を次の表2に示す。

【表2】

水溶液No.	HPC-SSL濃度 (w/w%)	非イオン性界面活性剤 及び濃度 (w/w%)	単量体残存率 (%)
比較例2	—	—	64.04±1.30
実施例8 A	0.05	HCO-60 0.05	99.20±1.16
実施例8 B	0.05	Pluronic F68 0.05	98.42±0.61
実施例8 C	0.05	Pluronic F68 0.10	97.96±1.34
実施例8 D	0.10	HCO-60 0.05	104.76±0.68
実施例8 E	0.10	HCO-60 0.10	104.81±0.17

n = 5、平均±標準偏差

【0054】

表2に見られるように、水溶液から粉末化する過程においてヒドロキシプロピルセルロースと非イオン性界面活性剤の双方を水溶液中に含有させておくことにより、r-hGHは実質上に完全に安定化された。このことは、水溶性の非イオン性有機結合剤ヒドロキシプロピルセルロースと非イオン性界面活性剤を併用することにより、これらの何れかを単独で用した場合よりも更に高い安定化効果が得られることを示している。

【0055】

上記の比較例1、2及び実施例1～8についての結果が示すように、生理活性ペプチドr-hGH含有の水溶液から粉末化する際の生理活性ペプチドの安定性は、ポリソルベート、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油及びポリキサマー等に代表される非イオン性界面活性剤、ヒドロキシプロピルセルロース及びポリビニルピロリドンに代表される水溶性の非イオン性有機結合剤、又は水素添加レシチンを、生理活性ペプチド水溶液中に添加しておくことにより、顕著に改善される。また、これらの成分を組み合わせることで添加することにより、生理活性ペプチドの安定化は更に改善され、ほぼ完全な安定化が達成できる。

【0056】

＜実施例9＞

マンニトール単独又はこれと他の添加剤との組み合わせによる安定化効果につき更に検討した。

(材料)

GHとしては組換えヒト成長ホルモン(r-hGH)原体を使用した。安定化剤としては、D-マンニトール、HPC-SSL、及びPluronic F68を用いた。

【0057】

(r-hGH溶液調製)

次の処方に従い、r-hGH及び各添加剤を秤取し、15.0mlの精製水に溶解させて噴霧溶液とした。対照として、r-hGHのみを15.0mlの精製水に溶解させて噴霧溶液とした(対照処方)。各処方において括弧内の重量%値は、固形成分の総重量に占める各固形成分の重量比を示す。

(処方M)

r-hGH	29.25mg	(6.5重量%)
D-マンニトール	420.75mg	(93.5重量%)
計	450.00mg	

(処方M-HP)

r-hGH	29.25mg	(6.5重量%)
-------	---------	----------

D-マンニトール 405.00 m g (90.0重量%)

HPC-SSL 15.75 m g (3.5重量%)

計 450.00 m g

(処方M-P)

r-hGH 29.25 m g (6.5重量%)

D-マンニトール 405.00 m g (90.0重量%)

Pluronic F68 15.75 m g (3.5重量%)

計 450.00 m g

[0058]

(噴霧乾燥)

噴霧乾燥装置としてEYELA SD-1000 Spray Dryerを用い、上記の各 r-hGH 溶液を噴霧乾燥して、乾燥粉末を得た。噴霧乾燥条件は次の通りとした。

入口温度: 90℃

乾燥空気量: $0.2\text{m}^3/\text{分}$

噴霧圧: 100 kPa

送液ポンプ流量: $2.6\text{ml}/\text{分}$

[0059]

(HPLC/単量体含量測定)

r-hGH単量体の測定のためのHPLC条件は次の通りとした。

HPLC装置: LC10A (島津製作所)

サンプル量: 約0.02 g/精製水0.5 ml

検出器: UV (280 nm)

分析カラム: TSK G3000SWXL (TOSOH)

カラム温度: 室温

移動相: 0.1Mリン酸二水素ナトリウム、0.1Mリン酸水素ナトリウム、0.2M塩化ナトリウム

流速: $0.6\text{ml}/\text{分}$

注入量: $50\mu\text{l}$

[0060]

(HPLC/脱アミド体含量測定)

r-hGHの脱アミド体の測定のためのHPLC条件は次の通りとした。

HPLC装置: LC10A (島津製作所)

サンプル量: 約0.02g/精製水0.5ml

検出器: UV (280nm)

分析カラム: Protein C4カラム (VYDAC, Cat.No. 214ATP54)

カラム温度: 45℃

移動相: 50mMトリス塩酸 (pH7.5) / n-プロパノール (71:29) 緩衝液

流速: 0.5ml/分

注入量: 50μl

[0061]

(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

1) サンプルの調製:

サンプルとして約0.04mg/mlの溶液を調製し、その10μlに水10μl及びサンプル緩衝液20μlを加えた。標準サンプルとしては、r-hGH原体約1.6mg/mlを調製し、その10μlに水10μl及びサンプル緩衝液20μlを加えた。

2) 泳動緩衝液の調製:

(A) 10ラ SDS-PAGE用泳動緩衝液は、トリス30.3g、グリシン144g、SDS10gに水を加えて1000mlとすることにより調製した (保存用)

(B) SDS-PAGE用泳動緩衝液は、10ラ SDS-PAGE用泳動緩衝液100mlに水900mlを加えることにより調製した。

(C) 0.25Mトリス塩酸 (pH6.8) 緩衝液は、トリス30.25gに水を加えて800mlとし室温にて6N塩酸でpH6.8に合わせた後、水で1000mlにメスアップすることにより調製した (冷凍保存)。

(D) SDS-PAGE用サンプル緩衝液は、0.25Mトリス塩酸 (pH6.8) 緩衝液25ml、SDS2g、ショ糖5g、ブロムチモールブルー (BPB) 2mgに水を加えて50mlとすることにより調製した。

3) SDS-PAGE

上記サンプル及び緩衝液を用いて、20mA/ゲルで常法により電気泳動を行った。

【0062】

(結果)

噴霧乾燥により得られたr-hGH粉末中のr-hGH単体含量及び脱アミド体含量の測定結果を次の表に示す。

【表3】

処 方	r-hGH残存率 (%)	脱アミド体含量 (%)
対 照	68.5	7.3
M	80.5	4.2
M-H P	91.4	4.5
M-P	88.4	4.7
原 体	—	3.1

【0063】

表1より明らかな通り、処方M、M-H P、M-Pの何れも、対照処方に対して遙かに高いr-hGH単量体残存率を示した。すなわち対照処方のr-hGH残存率が68.5%であったのに対し、処方Mのそれは80.5%であった。また、処方M-H P及びM-Pは、尚も高いr-hGH残存率を示した。脱アミド体については、対照に比して処方M、M-H P及びM-Pの何れも、低い値であり、用いた原体に元々含有される脱アミド体の割合(3.1%)と実質的な差はなかった。これに対し対照では、脱アミド体の2倍以上の増加が見られた。SDS-PAGEによる検討でも、対照処方より処方Mの方が、そして処方Mより処方M-H P及びM-Pの方が、それぞれ純度の高いことを示す泳動像を示した。

【0064】

<実施例10> in vivo試験用マンニトール配合r-hGH経肺投与用粉末
下記の処方に従い、r-hGH、HPC-SSL及びD-マンニトールを秤取し

、90mlの精製水に溶解させて噴霧溶液とした。処方において括弧内の重量%値は、固形分の総重量に占める各固形成分の重量比を示す。噴霧溶液中のr-hGH、及びHPC-SSLD-マンニトールの濃度は、それぞれ、0.27重量%、0.14重量%、及び2.92重量%である。噴霧乾燥及び分析は実施例9と同じ条件で行った。

(処方)

r-hGH 0.240 g (8.0重量%)

HPC-SSL 0.129 g (4.3重量%)

D-マンニトール 2.631 g (87.7重量%)

計 3.000 g

【0065】

噴霧乾燥して得られたr-hGH乾燥粉末を光学顕微鏡観察し、600個の粒子をランダムに選び粒子径を測定した。その結果、粒子径は $2.84 \pm 0.83 \mu\text{m}$ (平均 \pm SD、n=600)。この粉末のGHの主ピーク面積(%)と脱アミド体ピーク面積(%)は次の通りであった。

【0066】

【表4】

	単量体面積 (%)	脱アミド体面積 (%)
噴霧乾燥品	95.5	4.5
標準品	96.6	3.4

【0067】

<GH粉末のラット経肺投与による血中動態の検討>

GHの粉末をラットに経肺投与し、その後の血中GH動態を調べた。また、経肺投与したのと同量のGH粉末を水溶液にしてラットに皮下注射し、血中GH動態を、経肺投与で得られた結果と比較した。

【0068】

(使用動物)

経肺投与及び経皮投与のそれぞれにつき、9週齢の雄性Wistarラット6匹を使用した。

【0069】

(被検GH粉末)

上記実施例10で得られたr-hGH粉末を使用した。

【0070】

(r-hGHの投与)

経肺投与群のラットを1昼夜絶食させた後、ウレタン麻酔し、ラット体重当たり2mg/kgのr-hGH粉末をラット用の経肺投与器具(PennCentury)に入れ、装置のデリバリーチューブを気管内に挿入し、装置に連結したシリンジより3mlの空気を素早く押し出すことによりr-hGH粉末を肺内に放出した。経皮投与群のラットも同様に1昼夜絶食させた後、r-hGH粉末を精製水に懸濁させ、ラット体重当たりr-hGH2mg/kg相当量を皮下注射した。

【0071】

(血中サンプルの採取及び処理)

採血は、r-hGH投与直前及び投与後0、15、30、60、120、240、480、1440分の時点に行った。採血は、ラットを固定して頸静脈より行い、各回の採血量は300 μ lとした。各回の採血後、同量(300 μ l)の生理食塩水を頸静脈内投与した。採取した血液は、室温にて1時間及び4 $^{\circ}$ Cにて一晩放置した後遠心分離(15000rpm、10分間、4 $^{\circ}$ C)し、血清を分取した。

【0072】

(GH-ELISAによる血中r-hGH濃度の測定)

常法により作製した抗hGHウサギポリクローナル抗体を、0.05Mトリス緩衝液で希釈して、吸光度OD280=0.02となるように調整した。これを96穴プレートに100 μ lずつ注入し、37 $^{\circ}$ Cにて2時間インキュベートした。0.01Mリン酸緩衝液(洗浄緩衝液)でプレートを5回洗浄した。ブロック液(ブロックエース：大日本製薬)をプレートに満たし、4 $^{\circ}$ Cにて一晩放置した。上記の血清及び標準曲線用r-hGHを10倍ブロックエース水溶液で適当に希釈し、洗浄したプレー

トに100 μ lずつ注入し、37℃にて2時間プレインキュベートした。

【0073】

抗hGHウサギポリクローナル抗体を用いて常法により西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）接合抗hGHウサギポリクローナル抗体を作製し、これを10倍ブロッケーヌ水溶液で50000倍に希釈し、洗浄したプレートに100 μ lずつ注入し、37℃にて2時間プレインキュベートした。洗浄後、TMB試薬（BIORAD）のを100 μ lずつプレートに注入し、室温にて10分間反応させた後、1N硫酸により反応を停止させた。450nmにおける吸光度を測定した。標準溶液の吸光度より検量線を作成し、これを用いて各サンプルの吸光度から、それぞれのサンプル中のr-hGH濃度を求めた。

【0074】

（結果）

r-hGH粉末の経肺投与又はr-hGH懸濁液の皮下注射後のr-hGHの血中濃度測定結果を次の表5及び図4に示す。

【0075】

【表5】

投与後の 時間（分）	r-hGH血中濃度（ng/ml）	
	経肺投与	皮下注射
0	22.6	41.5
15	584.4	423.1
30	451.4	446.1
60	315.1	491.8
120	254.9	423.9
240	101.6	347.9
480	61.5	175.5
1440	34.7	51.3

【0076】

上記の表5及び図4より、上記実施例において製造したr-hGH粉末の経肺投与後のr-hGH血中濃度は、投与後15分でピーク値584.4ng/mlに達し、その後低下したが、投与後1440分においても34.7ng/mlの値を有していた。投与後480分までのAUC（血液動態曲線下の面積）は、経肺投与では128862ng/ml・分、同粉末の同量を含む懸濁液の皮下注射皮下注射では255826ng/ml・分であった。この製剤を皮下注射したときのr-hGHの血中への移行の効率が予想外に高いため、経肺投与直後を除きr-hGHの血中濃度は皮下注射したときそれには及ばなかったものの、上記の結果は、この製剤の経肺投与でのr-hGHの吸収が非常に良好であることを示している。実際、この製剤の経肺投与後の血中濃度は、次に掲げた比較例3での同量のr-hGH含有懸濁液を皮下注射又は経肺投与した後のr-hGHの血中濃度の何れよりも遙かに高かった。

【0077】

＜比較例3＞

下記の処方に従い、r-hGH及び乳糖を秤取し、120mlの精製水に溶解させて噴霧溶液とした。噴霧溶液中のr-hGH濃度及び乳糖濃度は、それぞれ、0.20w/w%及び2.30w/w%である。

（処方）

r-hGH 0.240 g（8.0重量%）

乳糖（1水和物） 2.760 g（92.0重量%）

計 3.000 g

【0078】

上記の噴霧溶液をそれぞれ次の条件で噴霧乾燥した。

入口温度： 120℃

乾燥空気量： 0.2m³/分

噴霧圧： 100kPa

送液ポンプ流量： 2.6ml/分

【0079】

上記噴霧乾燥して得られたr-hGH粉末につき、HPLCによる単量体及び脱アミド体の測定並びにSDS-PAGEを、既に記載したのと同じの方法で確認した。単量体ピーク面積及び脱アミド体ピーク面積は次表の通りであり、SDS-PAGEにより、純度の高いことを示す泳動像が得られた。

【0080】

【表6】

	単量体面積 (%)	脱アミド体面積 (%)
噴霧乾燥品	94.7	5.3
標準品	96.7	3.3

【0081】

この噴霧乾燥品について「GH粉末のラット経肺投与による血中動態の検討」の部に記載したのと同じの手順で、同一のr-hGH投与量を、各群6匹の9週齢の雄性Wistarラットに経肺投与又は皮下注射してr-hGHの血中動態を調べた。その結果を次表に示す。

【0082】

【表7】

投与後の 時間 (分)	r-hGH血中濃度 (ng/ml)	
	経肺投与	皮下注射
0	5	6
15	147	46
30	129	52
60	85	62
120	70	75
240	58	71
480	48	21
1440	37	5

【0083】

天然のヒト成長ホルモンの22K hGHは、191個のアミノ酸よりなり、分子内に2個のS-S結合を有する。これに対して、ヒトインスリンは51個のアミノ酸よりなり、やはり分子内に2個のS-S結合を有する。ヒトインスリンが、ヒト成長ホルモンより遙かに小型の分子である点で粘膜からの吸収に有利であること、及び2個のS-S結合を分子内に有するという構造的類似性をヒト成長ホルモンと共有することから、ヒト成長ホルモン含有の乳糖配合粉末を用いて上記の通り実証された経肺吸収は、ヒトインスリンを用いても起こることが十分に予測できる。また同様に、更にヒトインスリンのほぼ半分のサイズであるカルシトニン(32アミノ酸)、ソマトスタチン(28アミノ酸)についても、本発明の粉末とすることにより、経肺吸収させることのできる蓋然性が高い。

【0084】

【発明の効果】

本発明は、生理活性ペプチドを含有する水性液体を乾燥して粉末化するに際して、生理活性ペプチドの安定性を著しく高め、粉末化工程での生理活性ペプチド

の損失を最小限に止めることを可能にする。また、医薬品成分としての安全性の確立されている添加剤を用いてこれを行うことができるため、本発明は、添加剤面から製品の安全性に余分な懸念を引き起こすことなしに、生理活性ペプチドを安定に維持したままで粉末の製造を可能にする。またこれにより、本発明は、二量体等の変性ペプチドの含有を極力減らした生理活性ペプチド粉末の提供を可能にし、経鼻、経肺製剤等、粘膜に粉末の形で直接適用することにより循環血中に薬物を投与するタイプの製剤の製造を容易にする。また更に、本発明は、経肺投与により優れた効率で成長ホルモンやインスリンの血中移行させることのできる吸入用製剤の提供を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 非イオン性界面活性剤の効果を示すグラフ。

【図2】 水溶性の非イオン性有機結合剤の効果を示すグラフ。

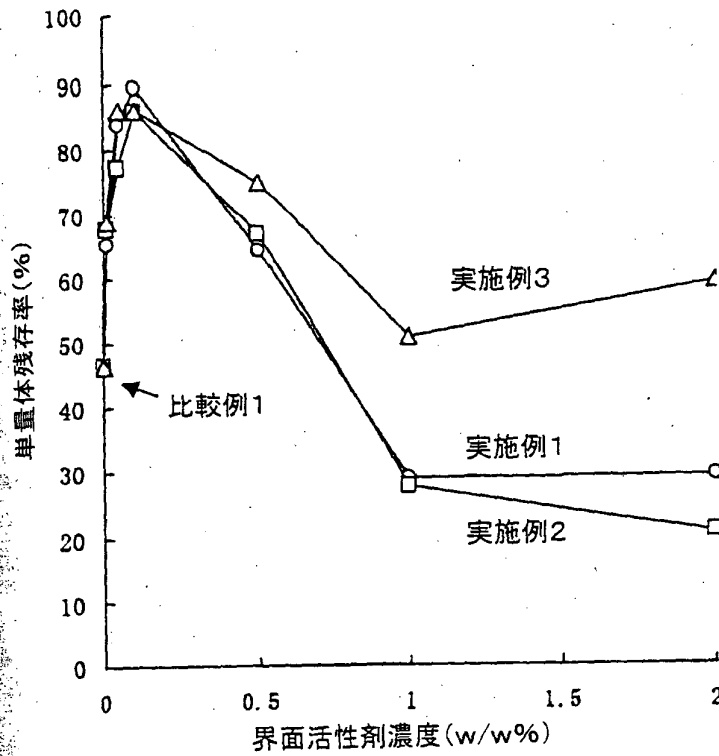
【図3】 水素添加レシチンの効果を示すグラフ。

【図4】 ヒト成長ホルモン粉末の経肺投与及び同量の皮下注射後のラット血中の成長ホルモン濃度の推移を示すグラフ。

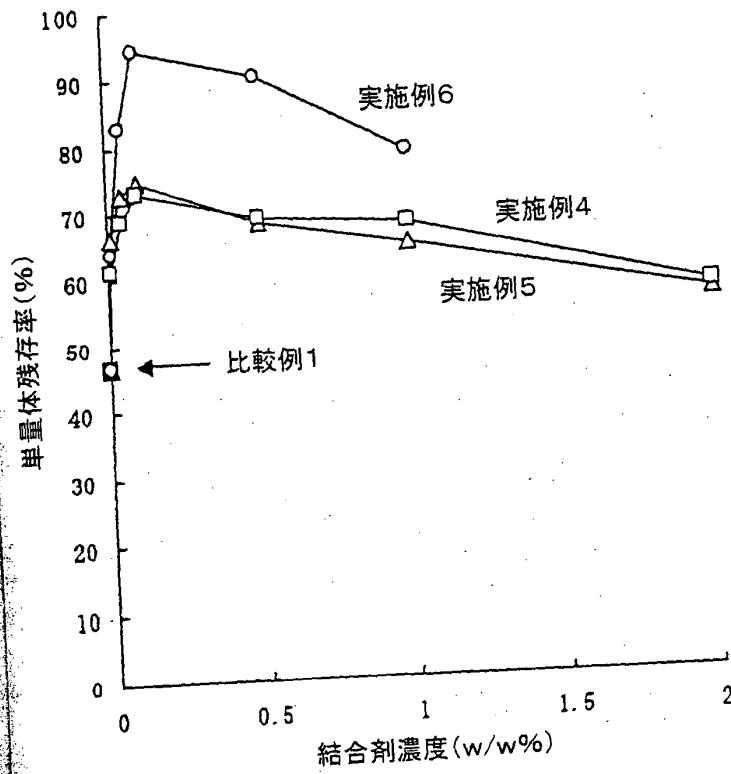
【書類名】

図面

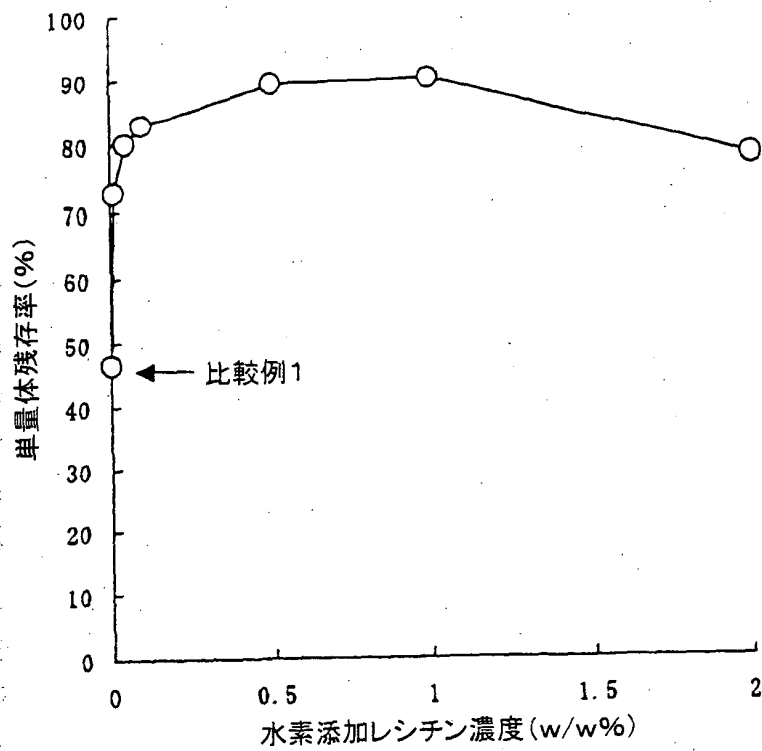
【図1】



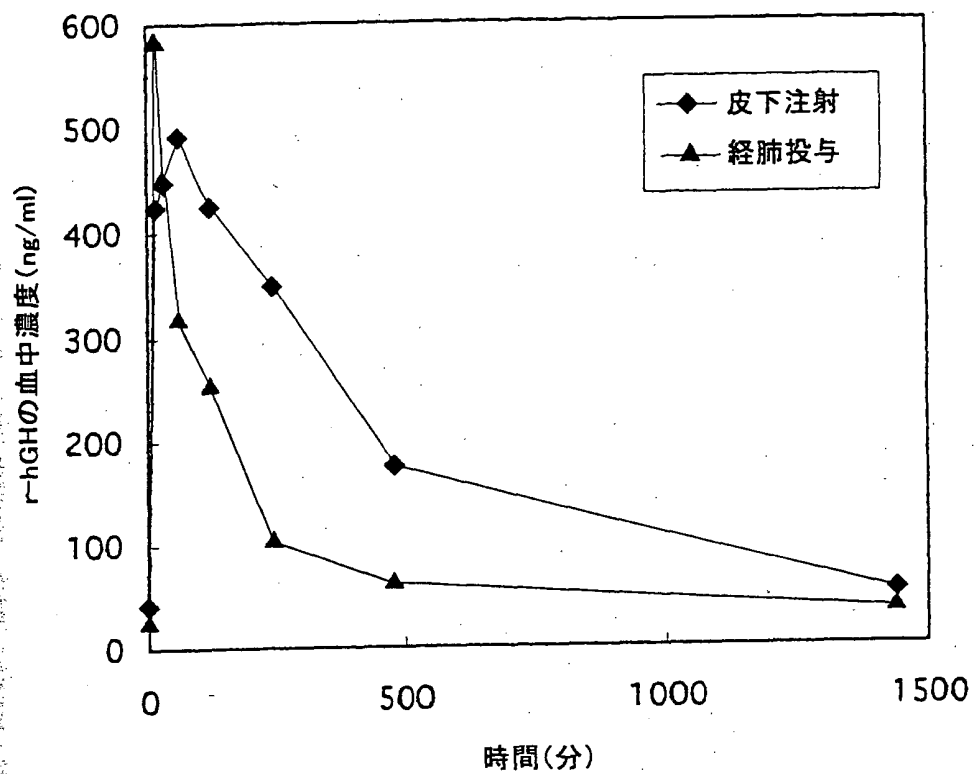
【図2】



【図3】



【図4】



【書類名】

要約書

【要約】

【課題】 粉末化する工程における生理活性ペプチドの安定性を改善すること及び吸入により生理活性ペプチドを吸収させるのに特に適した生理活性ペプチド含有粉末、及び吸入用製剤を提供すること。

【解決手段】 生理活性ペプチドを含有する水性液体を乾燥させて該生理活性ペプチド含有の粉末を製造するに際し、該生理活性ペプチドを安定化させるための方法であって、該水性液体に、非イオン性界面活性剤、水溶性の非イオン性有機結合剤、水素添加レシチン及びマンニトールよりなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物を含有させることを特徴とするものである方法。

【選択図】 なし

特2000-310693

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-310693
受付番号	50001315033
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0092
作成日	平成12年10月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成12年10月11日

次頁無

特2000-310693

出願人履歴情報

識別番号

{000228545}

1. 変更年月日

1994年11月30日

[変更理由]

住所変更

住所

兵庫県芦屋市春日町3番19号

氏名

日本ケミカルリサーチ株式会社